



УДК 577.152.344'14

ДУОДЕНАЗА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ АКТИВАТОР КАСКАДА ПИЩЕВАРИТЕЛЬНЫХ ПРОТЕИНАЗ

© 1998 г. Т. С. Замолотчикова[#], Е. А. Соколова, С. Л. Александров,
О. А. Миргородская*, И. А. Морозов**, Т. И. Воротынцева

Институт биоорганической химии им. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН,
117871, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

* Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург

** Институт питания РАМН, Москва

Поступила в редакцию 30.06.97 г. Принята к печати 22.12.97 г.

Исследована субстратная специфичность дуоденазы слизистой двенадцатиперстной кишки быка по отношению к синтетическим субстратам и полипептидам природного происхождения. Определены остатки аминокислот, предпочтительные для дуоденазы в P_1 - и P_2 -положениях субстрата. Показано, что фермент синтезируется в эпителиальных секреторных клетках дуоденальных (бруннеровых) желез и в составе секрета попадает в просвет двенадцатиперстной кишки. Обсуждается возможная роль дуоденазы как активатора проэнтеропептидазы.

Ключевые слова: дуоденаза; сериновая протеиназа; субстратная специфичность; бруннеровы железы; активация проэнтеропептидазы.

Основные этапы протеолитического конвейера, осуществляющего расщепление белковых молекул в желудочно-кишечном тракте, выяснены достаточно давно. Пренебрегая незначительным количеством протеиназ в слюне, можно считать, что дезагрегация и протеолиз белков начинаются в желудке под действием пепсина. Основное же расщепление полипептидов осуществляется в двенадцатиперстной кишке под действием протеиназ поджелудочной железы (трипсина (КФ 3.4.21.4), химотрипсина (КФ 3.4.21.1), эластазы (КФ 3.4.21.36) и некоторых других). Известно, что ферменты поджелудочной железы синтезируются как неактивные предшественники, активация которых осуществляется только в двенадцатиперстной кишке [1]. До последнего времени считалось, что ключевым ферментом, находящимся на вершине активационного каскада, является энтеропептидаза (КФ 3.4.21.9), которая превращает трипсиноген в активный трипсин [2].

В ходе очистки энтеропептидазы из слизистой двенадцатиперстной кишки быка мы не так давно обнаружили дуоденазу – ранее неизвестную сериновую протеиназу [3]. Настоящее сообщение посвящено характеристике каталитических свойств дуоденазы и клеточной локализации места синте-

за и секреции фермента. Обсуждается биологическая роль этого фермента.

Дуоденаза – это гликопротеин с небольшим (около 3%) содержанием углеводов и молекулярной массой около 27 кДа [3]. Первичная структура дуоденазы была определена ранее нами методом секвенирования перекрывающихся пептидов [4]. В полипептидной цепи фермента имеются консервативные участки, характерные для сериновых протеиназ, и каталитическая триада активного центра – His44, Asp87 и Ser181. Неожиданным оказалось весьма значительное структурное сходство дуоденазы с сериновыми протеиназами цитотоксических Т-лимфоцитов и тучных клеток, а также с лейкоцитарным катепсином G, образующими семейство гранзимоподобных протеиназ [5, 6]. С этими протеиназами дуоденаза имеет около 50% структурного сходства, тогда как с трипсином и химотрипсином сходство не превышает 30%. Гранзимоподобные протеиназы обнаружены сравнительно недавно, и, несмотря на интенсивное исследование, их биологическая роль изучена мало.

Субстратная специфичность дуоденазы

Исследуя в качестве субстратов дуоденазы ряд природных и синтетических пептидов, мы обнаружили, что фермент проявляет выраженную избирательность при их гидролизе (табл. 1). Как видно из табл. 1, большинство исследованных

Сокращения: -NH-Np – л-нитроанилид.

[#] Автор для переписки (e-mail: Tatyana@enzyme.siocb.ras.ru).

субстратов гидролизировались дуоденазой сравнительно медленно (по величине k_{cat}/K_m). В P_1 -положении субстрата (номенклатура Шехтера и Бергера [7]) остаток Lys в 20 раз более предпочтителен, чем остаток Arg (ср. соединения (10) и (11)). У пептидов, расщепляемых дуоденазой, в положении P_1 помимо остатков, несущих положительный заряд, возможен гидрофобный остаток Phe, однако специфичность дуоденазы к таким субстратам, по-видимому, ниже, чем к субстратам с положительно заряженным P_1 -остатком. Таким образом, условно субстратную специфичность дуоденазы можно охарактеризовать как двойную: трипсиноподобную и химотрипсиноподобную с превалирующей трипсиноподобной активностью. Тем не менее дуоденаза существенно отличается от трипсина, и, чтобы наглядно это продемонстрировать, мы сравнили действие двух ферментов на “лучшие”, “средние” и “плохие” субстраты дуоденазы. Данные, приведенные в табл. 2, свидетельствуют, что трипсин гидролизует все выбранные субстраты почти одинаково эффективно и они расщепляются намного быстрее, чем в случае дуоденазы. Субстрат (12) дуоденаза расщепляет только на порядок хуже трипсина, тогда как другие трипептиды – на 2–3 порядка менее эффективно. Последние два субстрата, приведенные в табл. 2, дуоденаза практически не расщепляет.

Более полную характеристику субстратной специфичности дуоденазы мы надеялись получить, исследуя действие фермента на белковые и природные пептидные субстраты. Были выбраны 10 субстратов дуоденазы (бычий сывороточный альбумин, свиной проинсулин, мелиттин, глюкогон и некоторые другие). Как и предполагалось, чувствительными к дуоденазе во всех исследованных субстратах были пептидные связи, образованные карбоксильной группой остатков Lys, Arg, Phe, а также Tyr и Leu (положение P_1 субстрата). Наблюдали единичные случаи расщепления по остаткам Val и Tyr. Для всех субстратов была определена частота встречаемости остатков в позициях от P_4 до P_1 по отношению к гидролизуемой связи (табл. 3). Наиболее определенно обозначилась специфичность дуоденазы к остаткам аминокислот в P_1 - и P_2 -положениях. Согласно нашим данным, 63% общего числа пептидных связей, расщепленных дуоденазой, принадлежат остаткам Lys или Arg, причем Lys встречается в P_1 -положении вдвое чаще, чем остаток аргинина. Частота встречаемости гидрофобных остатков в положении P_1 субстрата существенно ниже и составляла 10% (для остатков Phe, Leu и Tyr). В позиции P_2 доминирующим является остаток Phe. Он встречается в этой позиции в каждом четвертом случае. Частота встречаемости других остатков в P_2 -положении значительно

Таблица 1. Кинетические константы гидролиза синтетических субстратов дуоденазой*

Субстрат	P_6	P_5	P_4	P_3	P_2	P_1^{**}	k_{cat}, c^{-1}	K_m, mM	$k_{cat}/K_m, M^{-1}c^{-1}$
(1)					Bz	Arg	Нет гидролиза		
(2)				Glu	Gly	Arg	Почти нет гидролиза		
(3)			Ac	Leu	Leu	Arg	0.01	10.4	1.0
(4)			Ac	Leu	Lys	Arg	0.02	3.20	6.3
(5)			Bz	Val	Gly	Arg	0.10	0.54	190
(6)			Cbz	Ala	Ala	Arg	0.24	0.83	290
(7)		Cbz	Ala	Ala	Ala	Arg	0.27	0.90	300
(8)	Cbz	Ala	Ala	Ile	Arg	Arg	0.10	0.28	360
(9)			Boc	Gly	Phe	Arg	0.41	0.20	2000
(10)			Tos	Gly	Pro	Arg	2.00	1.00	2000
(11)			Tos	Gly	Pro	Lys	13.00	0.37	35000
(12)			Suc	Thr	Pro	Lys	7.3	0.39	18000
(13)			Suc	Ser	Pro	Lys	2.60	1.00	2600
(14)				D-Val	Leu	Lys	1.30	1.25	1000
(15)	Gly	Asp	Asp	Asp	Asp	Lys	0.016	0.68	24
(16)					Ac	Tyr	Нет гидролиза		
(17)			Suc	Gly	Gly	Phe	Почти нет гидролиза		
(18)			Suc	Ala	Ala	Phe	0.06	0.80	75
(19)			Suc	Val	Pro	Phe	0.55	0.64	850
(20)		Suc	Ala	Ala	Pro	Phe	0.09	0.42	214
(21)		Suc	Ala	Ala	Pro	Leu	0.05	0.62	81

* 10 mM трис-HCl, pH 8.0; 37°C; λ 405 nm.

** Остаток в положении P_1 представлен в виде *n*-нитроанилида (в соединении (15) – в виде β -нафтиламида).

ниже. Таким образом, по данным гидролиза дуоденазой полипептидных субстратов природного происхождения можно предполагать, что дуоденаза наиболее эффективно гидролизует пептидные связи, образованные остатком лизина, которому предшествует остаток пролина; это предположение находит подтверждение также при рассмотрении данных по гидролизу синтетических субстратов (табл. 1).

При сравнительном анализе аминокислотной последовательности дуоденазы и трипсина в области остатков, образующих субстратсвязывающий участок, нами были выявлены существенные различия [4]. Известно, что детерминантой специфичности трипсина и трипсиноподобных ферментов является остаток аспарагиновой кислоты в положении 189 (нумерация остатков по химотрипсиногену) [8]. Для дуоденазы, по-видимому, критическим для специфичности является остаток Asp226. Положение 189 в полипептидной цепи дуоденазы занимает остаток аспарагина [4].

Таблица 2. Сравнение кинетических параметров гидролиза трипсином и дуоденазой некоторых субстратов дуоденазы*

Субстрат	Фермент	k_{cat} , c^{-1}	K_m , мМ	k_{cat}/K_m , $M^{-1} c^{-1}$	Трипсин/дуоденаза**
Suc-Thr-Pro-Lys-NH-Np (12)	Трипсин	29.0	0.11	260000	14
	Дуоденаза	7.3	0.39	18000	
Suc-Ser-Pro-Lys-NH-Np (13)	Трипсин	15.0	0.06	250000	96
	Дуоденаза	2.6	1.00	2600	
Boc-Gly-Phe-Arg-NH-Np (9)	Трипсин	12.0	0.06	200000	100
	Дуоденаза	0.4	0.20	2000	
Bz-Val-Gly-Arg-NH-Np (5)	Трипсин	53.5	0.25	210000	1100
	Дуоденаза	0.1	0.54	190	
H-Glu-Gly-Arg-NH-Np (2)	Трипсин	94.0	0.13	720000	Почти нет гидролиза
	Дуоденаза				
Bz-Arg-NH-Np (1)	Трипсин	2.7	3.9	700	Почти нет гидролиза
	Дуоденаза				

* 10 мМ трис-НСl, рН 8.0; 37°C; λ 405 нм.

** Отношение значений k_{cat}/K_m для двух ферментов.

Когда в субстратсвязывающем участке трипсина крысы методом точечного мутагенеза был перемещен отрицательный заряд из 189-го положения в 226-е [9], подобно тому как это “сделала природа” в дуоденазе, полученный мутант по свойствам приблизился к дуоденазе и стал на порядок более “медленным” ферментом и в противоположность исходному трипсину предпочитал остаток лизина в P_1 -положении остатку аргинина.

Вопрос о биологической роли дуоденазы стоял перед нами с момента открытия фермента. Небольшие скорости превращения субстратов дуоденазой и выраженная селективность фермента указывают на то, что его биологическая роль может быть связана скорее с регуляторными функциями, чем с деструктивными, несмотря на то что обнаружена дуоденаза в двенадцатиперстной кишке, где доминируют процессы именно деструкции макромолекул.

Локализация дуоденазы

Ключ к пониманию биологической роли дуоденазы могло бы дать определение ее клеточной локализации. Слизистая оболочка тонкого кишечника устроена довольно сложно, что обусловлено многофункциональностью этого органа. Среди его функций можно выделить не только метаболическую, но и секреторную, гормональную и защитную. В связи с этим важно было соотнести биосинтез дуоденазы с определенным типом клеток слизистой. С этой целью были проведены иммунофлуоресцентные [10] и иммуноцитохимические (с использованием электронной микроскопии) [10, 11] исследования.

На рис. 1 представлен срез слизистой двенадцатиперстной кишки, последовательно обработанный моноспецифическими антителами к дуоденазе и вторичными антителами, содержащими флуоресцентную метку (флуоресцеинизотиоцианат) [10]. Интенсивную флуоресценцию обнаруживают эпителиальные секреторные клетки бруннеровых (дуоденальных) желез, выглядящие на рисунке как округлые образования. Дуоденальные железы характерны именно для двенадцатиперстной кишки, и их роль связывают с секрецией в просвет кишки слизи, обладающей буферными свойствами. Секрет дуоденальных желез защищает слизистую кишечной стенки от агрессивной среды, что особенно важно в верхнем отделе двенадцатиперстной кишки, где вероятен выброс кислого содержимого из желудка. Недостаточность функционирования дуоденальных желез называют в числе причин, вызывающих язву двенадцатиперстной кишки [12].

Электронно-микроскопические исследования с использованием комплекса белок А–золото [10, 11] подтвердили данные, полученные методом иммунофлуоресценции, и расширили наши представления об ультраструктурной локализации дуоденазы. На рис. 2 четко различимы три секреторные эпителиальные клетки дуоденальной железы, содержащие многочисленные секреторные гранулы. Локализация частиц коллоидного золота (на рисунке они выглядят как черные точки) указывает на присутствие дуоденазы в секреторных гранулах. Кроме секреторных гранул метка присутствует в выводном протоке дуоденальной железы (верхняя часть рисунка), что свидетельствует о секреции дуоденазы в просвет двенадцатиперстной кишки.

надцатиперстной кишки. В эпителиоцитах, покрывающих ворсинки двенадцатиперстной кишки, на их гликокаликсе частицы коллоидного золота отсутствовали. Не было их на поверхности и внутри лимфоцитов, тучных клеток и макрофагов, инфильтрующих слизистую.

Таким образом, можно с определенностью считать дуоденазу секреторным белком, который в составе секрета дуоденальных желез поступает в просвет двенадцатиперстной кишки.

Предположение о биологической роли дуоденазы

Учитывая данные об энзиматических свойствах фермента и его локализации, мы сузили область поиска природного субстрата дуоденазы и обратили внимание на процессы, протекающие в области просвета двенадцатиперстной кишки и требующие участия регуляторных протеиназ. Классическим примером такого процесса является каскад активации предшественников пищеварительных ферментов, поступающих в просвет двенадцатиперстной кишки из поджелудочной железы [1, 2].

Недавно методом клонирования кДНК было показано, что ключевой фермент этого каскада – энтеропептидаза синтезируется в виде предшественника, процессинг которого требует участия некоей протеиназы, гидролизующей определенную пептидную связь в сайте активации, в результате чего образуются две цепи активного фермента [13–16]. Следует отметить, что энтеропептидаза синтезируется в энтероцитах двенадцатиперстной кишки, в которой функционируют многочисленные дуоденальные железы, секретирующие дуоденазу [15]. На рис. 3 представлены сайты активации проэнтеропептидаз различного происхождения. Расщепление связи Lys-Ile приводит к разделению тяжелой и легкой (каталитической) цепей энтеропептидазы. Примечательно, что остатки P₁ и P₂ (Lys и Pro соответственно) во всех приведенных зимогенах строго консервативны и абсолютно соответствуют специфичности дуоденазы.

Поскольку дуоденаза содержится в секрете дуоденальных желез, поступающем в пристеночную зону двенадцатиперстной кишки, где происходит синтез энтеропептидазы энтероцитами: рН 8, характерный для пристеночной зоны дуоденума, совпадает с рН-оптимумом дуоденазы и, наконец, активационный сайт проэнтеропептидазы явно соответствует специфичности дуоденазы, мы предположили, что дуоденаза является активатором зимогена энтеропептидазы.

Чтобы проверить состоятельность нашей гипотезы, были синтезированы производные *п*-нитроанилина, содержащие последовательности P₁–P₃ сайта активации проэнтеропептидазы быка

Таблица 3. Частота встречаемости (%) остатков аминокислот в P₄–P₄'-положениях по отношению к расщепленным дуоденазой пептидным связям (число расщепленных пептидных связей – 41, субстратов – 10)

Остаток	P ₄	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁ '	P ₂ '	P ₃ '	P ₄ '
Ala	7.1	4.8	4.8	–	9.5	4.8	4.8	–
Val	2.4	11.9	9.5	2.4	11.9	9.5	7.1	16.6
Phe	–	2.4	2.4	9.5	–	–	9.5	4.8
Ile	7.1	11.9	2.4	–	–	2.4	7.1	4.8
Leu	11.9	7.1	4.8	9.5	9.5	19.0	4.8	9.5
Pro	4.8	–	23.8	–	–	–	7.1	2.4
Met	–	2.4	–	–	2.4	2.4	–	–
Asp	7.1	2.4	2.4	–	–	–	4.8	9.5
Glu	7.1	–	4.8	–	7.1	7.1	11.9	16.6
Lys	4.8	9.5	7.1	45.2	2.4	7.1	4.8	4.8
Arg	4.8	9.5	9.5	21.4	9.5	7.1	4.8	–
Ser	16.6	2.4	4.8	–	11.9	2.4	7.1	4.8
Thr	–	9.5	9.5	–	14.3	4.8	7.1	9.5
Tyr	7.1	4.8	–	9.5	2.4	7.1	2.4	–
Asn	4.8	–	2.4	–	4.8	–	4.8	–
Gln	–	4.8	7.1	–	2.4	11.9	2.4	2.4
His	–	4.8	4.8	–	2.4	5.3	2.6	2.6
Trp	–	2.4	–	2.4	2.4	4.8	–	–
Gly	7.1	–	–	–	7.1	2.4	4.8	7.1

(Suc-Ser-Pro-Lys-NH-Np), человека (Suc-Thr-Pro-Lys-NH-Np) и крысы (Tos-Gly-Pro-Lys-NH-Np) (табл. 1, соединения (11)–(13)). Оказалось, что именно эти субстраты наиболее эффективны для

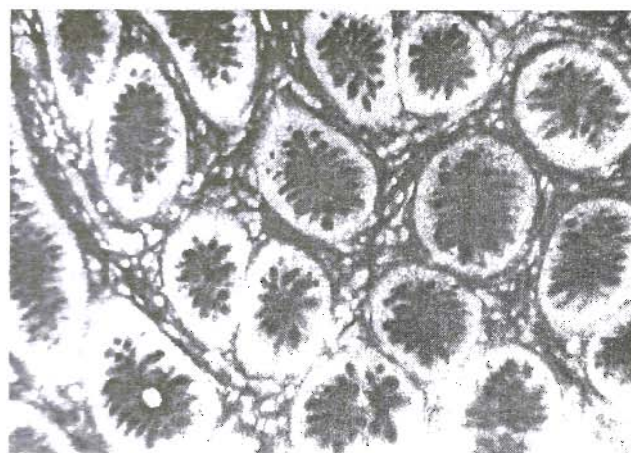


Рис. 1. Локализация дуоденазы в срезах (0.5 мкм) слизистой двенадцатиперстной кишки быка методом иммунофлуоресценции [10] (увеличение ×250): дуоденальные железы выглядят как округлые структуры.

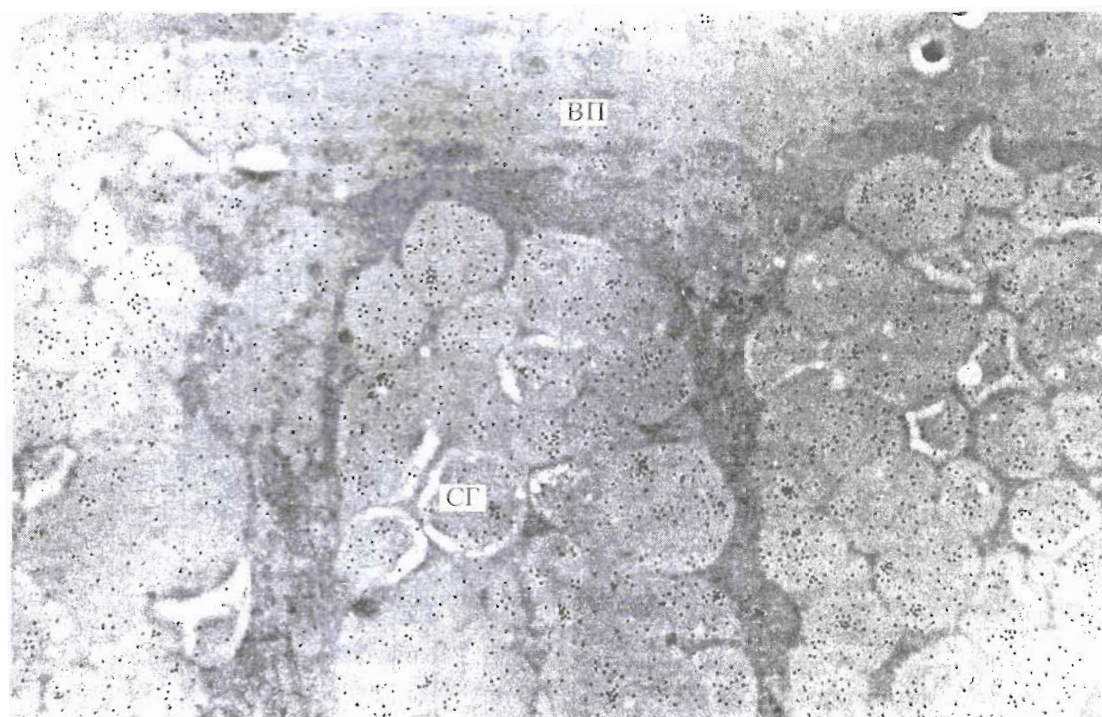
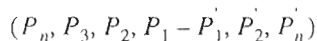


Рис. 2. Ультраструктурная локализация дуоденазы в эпителиоцитах дуоденальных желез быка с использованием комплекса белок А–золото [10]. Продукт иммунохимической реакции на дуоденазу (на рисунке выглядит как черные точки) обнаруживается в секреторных гранулах (СГ) эпителиоцитов и в составе секрета в выводных протоках (ВП) дуоденальных желез. Увеличение $\times 30000$.

дуоденазы и имеют лучшие значения величин k_{cat}/K_m .

Для дальнейшей проверки нашего предположения был синтезирован 14-членный пептид, содержащий P_9-P_5 -последовательность сайта активации проэнтеропептидазы быка (LVTQEVSPKIVGGG) [14]. Единственная связь, которую гидролизует дуоденаза в этом субстрате, соответствует процессируемой связи в полипептидной цепи проэнтеропептидазы (Lys-Ile). Определены



KLVTQEVSPK – IVGG	Бык
KQVAQEVSPK – IVGG	Свинья
KMVTQKVGPK – IVGG	Крыса
KLA AQDITPK – IVGG	Человек

_____ _____	
Тяжелая цепь	Легкая цепь

Рис. 3. Последовательности остатков аминокислот, окружающие сайты активации проэнтеропептидаз быка [14], свиньи [13], человека [16] и крысы [15]. Черточкой изображена расщепляемая в процессе активации пептидная связь.

кинетические параметры гидролиза этого субстрата дуоденазой ($K_m = 8.7 \times 10^{-5} \text{ M}$; $k_{\text{cat}} = 1.4 \text{ c}^{-1}$, $k_{\text{cat}}/K_m = 16000 \text{ M}^{-1} \text{ c}^{-1}$). Тетрадекапептид оказался в 6 раз более эффективным, чем соответствующий аналог – нитроанилид трипептида (13), в основном за счет более низкого значения константы Михаэлиса.

В настоящее время мы не располагаем прямыми доказательствами биологической роли дуоденазы, однако результаты, изложенные в этом сообщении, могут рассматриваться как весомый аргумент в пользу ее активаторной функции в отношении проэнтеропептидазы.

Работа выполнялась при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 96-04-49898).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rinderknecht H. // Dig. Dis. Sci. 1986. V. 31. P. 314–321.
2. Neurath H., Walsh K.A. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1976. V. 73. P. 3825–3832.
3. Антонов В.К., Воротынцева Т.И., Замолотчикова Т.С. // Докл. АН. 1992. V. 6. P. 1318–1322.
4. Zamolodchikova T.S., Vorotyntseva T.I., Nazimov I.V., Grishina G.A. // Eur. J. Biochem. 1995. V. 227. P. 873–879.

5. Jenne D.E., Tschopp J. // Current Topics in Microbiology and Immunology / Ed. E.D. Podack. Berlin et al.: Springer-Verlag, 1989. P. 33–47.
6. Woodbury R.G., Neurath H. // FEBS Lett. 1980. V. 114. P. 189–196.
7. Shechter I.V., Berger A.C. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1967. V. 27. P. 157–162.
8. Ruchlmann A., Kukla D., Schwager P., Bartels K., Huber R. // J. Mol. Biol. 1973. V. 77. P. 417–436.
9. Perona J.J., Tsu Ch.A., McGraph M.E., Craik Ch.S., Flettrick R.J. // J. Mol. Biol. 1993. V. 230. P. 934–949.
10. Zamolodchikova T.S., Sokolova E.A., Alexandrov S.L., Mikhaleva I.I., Prudchenko I.A., Morozov I.A., Kononenko N.V., Mirgorodskaya O.A., Da Ui, Larionova N.I., Pozdnev V.F., Ghosh D., Duax W.L., Vorotyntseva T.I. // Eur. J. Biochem. 1997. V. 249. P. 612–621.
11. Морозов И.А., Воротынцева Т.И., Замолодчикова Т.С. // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 1996. V. 82. P. 114–120.
12. Guiton A.G. Textbook of Medical Physiology. Philadelphia, London, Toronto: W.B. Saunders Company, 1976.
13. Matsushima M., Ichinose M., Yahagi N., Kakei N., Tsukada S., Miki K., Kurokawa K., Tashiro K., Shiokawa K., Shinomiya K., Umeyama H., Inoue H., Takahashi T., Takahashi K. // J. Biol. Chem. 1994. V. 269. P. 19976–19982.
14. Kitamoto Ya., Yuan X., Wu Q., McCourt D.W., Sadler J.E. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 7588–7592.
15. Yahagi N., Ichinose M., Matsushima M., Matsubara Y., Miki K., Kurokawa K., Fukamachi H., Tashiro K., Shiokawa K., Kageyama T., Takahashi T., Inoue H., Takahashi K. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1996. V. 219. P. 806–812.
16. Kitamoto Y., Veile R.A., Donis-Keller H., Sadler E. // Biochemistry. 1995. V. 34. P. 4562–4568.

Duodenase, a Potential Activator of the Digestive Protease Cascade

T. S. Zamolodchikova*, E. A. Sokolova*, S. L. Aleksandrov, O. A. Mirgorodskaya**,
I. A. Morozov***, and T. I. Vorotyntseva*

*Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences,
ul. Miklukho-Maklaya 16/10, Moscow, 117871 Russia

**Institute of Cytology, Russian Academy of Sciences, St. Petersburg, Russia

***Institute of Nutrition, Russian Academy of Medical Sciences, Moscow, Russia

The substrate specificity of duodenase from bovine duodenum mucosa to synthetic and natural polypeptides was studied. Amino acid residues preferential for duodenase in the P_1 and P_2 positions of the substrate were determined. It was shown that the enzyme is synthesized in epithelial secretory cells of duodenal (Brunner's) glands and enters, as part of the secretum, into the lumen of the duodenum. The possible role of duodenase as an activator of proenteropeptidase is discussed.

Key words: duodenase; serine protease; substrate specificity; Brunner's glands; proenteropeptidase, activation